

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MEHANIZAM OTROV- PROTUOTROV
(TOXIN-ANTITOXIN SYSTEM)

SEMINARSKI RAD

Katarina Matković
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2018.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Otrovi i protuotrovi	2
2.1. Otrovi	2
2.2. Protuotrovi.....	3
2.3. Mehanizmi regulacije sustava tipa I i II	6
3. Biološke funkcije sustava otrov-protuotrov	7
4. Sustavi otrov-protuotrov u genomu <i>E.coli</i> K-12	10
5. Literatura	12
6. Sažetak	15
7. Summary	16

1.Uvod

Tijekom 40-ih i 50-ih godina prošlog stoljeća, znanstvenici su se intenzivno bavili istraživanjima citoplazmatskih komponenti koje se mogu prenositi iz stanice u stanicu. Cilj istraživanja bio je odrediti prirodu tih komponenti te njihovu ulogu u stanici. Pojam plazmid predložio je Joshua Lederberg, 1952. godine, kao opći naziv za sve vankromosomalne nasljedne elemente. Taj naziv je općeprihvaćen tek 1970-ih godina.

Danas je poznato da su plazmidi male molekule DNA koje nose gene različite od onih u kromosomskoj DNA i repliciraju se neovisno. Najčešće se nalaze u bakterijama u obliku kružne dvolančane DNA i nose dodatne gene koji stanicama služe za preživljavanje u stresnim uvjetima. U većini slučajeva su to geni za otpornost na antibiotike.

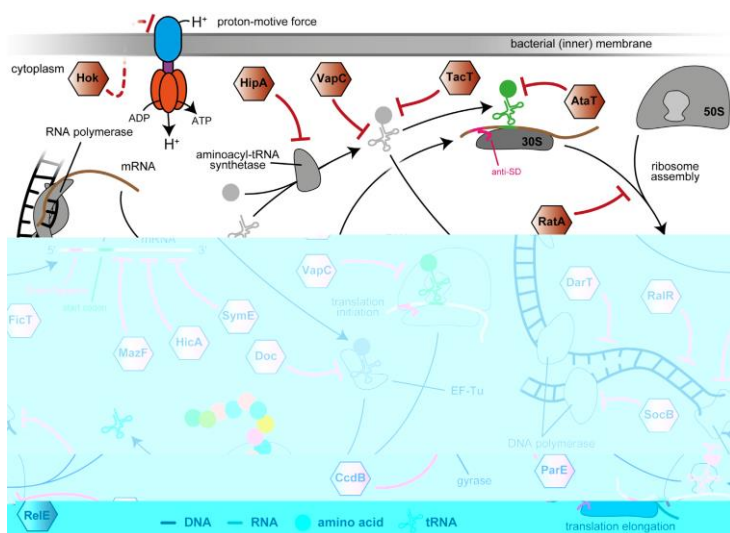
Uslijed brojnih dioba može se dogoditi da stanice izgube određeni plazmid. Bakterije imaju brojne mehanizme kojima reguliraju broj plazmida u stanici. Jedan od mehanizama rezultira smrću ili inhibicijom rasta stanice kćeri koja je izgubila plazmid. Prvi genski lokusi povezani s tim mehanizmom otkriveni su na plazmidima F i R1 u bakteriji *E. coli* te je mehanizam dobio ime postsegregacijsko ubijanje ili sprječavanje gubitka plazmida od *eng.* post-segregational killing (Gerdes i sur., 1986; Ogura i Hiraga, 1983). Danas je poznat veliki broj takvih lokusa koji imaju različite mehanizme i uloge u stanici. Zajedničkim imenom nazivaju se sustav otrov-protuotrov.

Ovaj seminarski rad će se osvrnuti na različite tipove sustava otrov-protuotrov, njihove mehanizme i biološke uloge u stanici. Najveći broj lokusa, koji kodiraju komponente sustava otrov-protuotrov, pronađeni su i detaljno istraženi u bakterijskom soju *E. coli* K-12 te su stoga obrađeni u zasebnom poglavlju rada.

2. Otrovi i protuotrovi

2.1. Otrovi

Otrovi su proteini koji inhibiraju rast stanice tako što interferiraju s vitalnim procesima, poput translacije i replikacije molekule DNA. Najčešće su to enzimi koji uzrokuju inhibiciju translacije (Slika 1). Mogući razlog tomu je što se manjak funkcionalnih mRNA, tRNA ili rRNA molekula može nadoknaditi novom transkripcijom. Stoga je manja mogućnost da nastane nepovratna šteta za stanicu u slučaju da dođe do slučajne aktivacije otrova (Harms i sur., 2018).



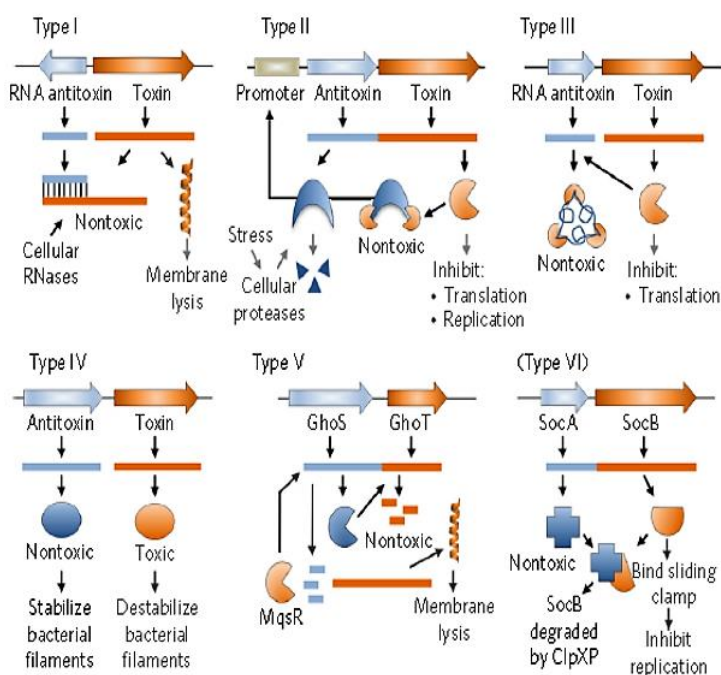
Slika 1. Mehanizam djelovanja većine porodica otrova na translaciju. Preuzeto od: Harms i sur., 2018.

Otrovi su svrstani u brojne porodice temeljem mehanizma kojim djeluju na metu. Eksperimentalne analize su pokazale da unutar porodica postoje velike razlike u specifičnosti mete (Harms i sur., 2018). Jedan od primjera su otrovi porodice GNAT (GCN5-vezane N-acetiltransferaze) koji acetiliraju i tako inaktiviraju tRNA. Dok neki otrovi u toj porodici imaju širok spektar tRNA koje napadaju, otrov AtaT iz enterohemoragične *E. coli* O157:H7 acetilira isključivo inicijatorsku tRNA^{fMet}. Mehanizam djelovanja otrova AtaT se temelji na prebacivanju acetilne skupine s acetil-CoA na amino skupinu metionil-aminoacilnog dijela tRNA^{fMet}. Takva AcMet – tRNA^{fMet} ne može vezati inicijacijski faktor 2 (IF2), čime se narušava translacijski inicijacijski kompleks (Jurėnas i sur., 2017).

Jedni od najistraživanijih otrova su oni iz porodice MazF/Kid. To su endoribonukleaze neovisne o ribosomima i specifične za određene sljedove i okvire čitanja. MazF iz *E. coli* je prva takva otkrivena ribonukleaza, specifično prepoznaje triplet ACA te ga reže samo ukoliko je u okviru čitanja (Masuda i Inouye, 2017).

2.2. Protuotrovi

RNA molekule ili proteini koji štite stanicu od otrova nazivaju se protuotrovi. Postoji više tipova sustava otrov-protuotrov, a razlikuju se na osnovu mehanizma djelovanja protuotrova na otrov. Četiri glavna tipa su: tip I, tip II, tip III i tip IV. Postoje i još dva specifična primjera koji su nazvani tip V i tip VI (Page i Peti, 2016). Primjeri svih tipova prikazani su na Slici 2.

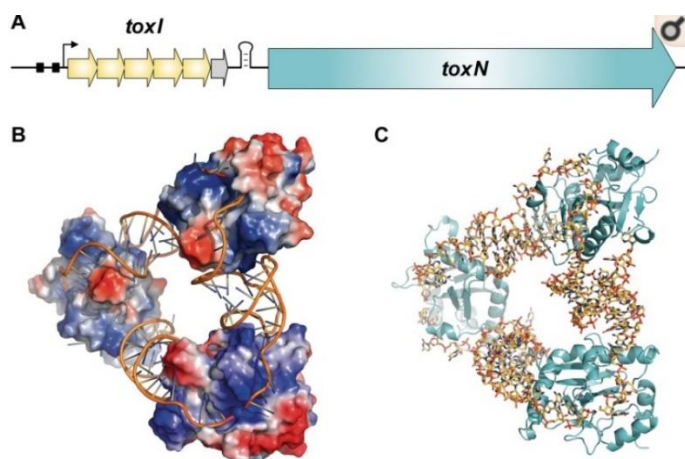


Slika 2. Primjeri svih tipova sustava otrov-protuotrov. Objašnjena tipova nalaze se u daljnjem tekstu. Preuzeto od: Page i Peti, 2016.

Protuotrovi tipa I su nekodirajuće RNA molekule koje reguliraju translaciju otrova. Takve male molekule RNA se komplementarno sparuju s mRNA otrova i time onemogućavaju vezanje ribosoma i translaciju (Page i Peti, 2016). U normalnim uvjetima takav RNA heterodupleks brzo razgradi RNaza III. Međutim, u stresnim uvjetima dolazi do smanjenja količine RNA protuotrova pa se slobodne mRNA otrova mogu translatirati (Page i Peti, 2016). Prvi otkriveni sustav tog tipa je *hok/sok* na plazmidu R1 (Gerdes i sur., 1986), a potom su homolozi otkriveni i na kromosomima brojnih bakterijaskih vrsta, uključujući *tisB/istR-1*, *ldr/rdl*, *ibs/sib* i *dinQ/agrB* na *E.coli* (Harms i sur., 2018). Novija istraživanja na kromosomima patogene bakterije *Helicobacter pylori* pokazala su da sustav *aapA1/isoA1* ima jako sličan mehanizam djelovanja kao oni kod *E. coli*, iako nema evolucijske povezanosti (Harms i sur., 2018).

Najistraživaniji tip sustava otrov-protuotrov je tipa II. U protuotrove tog tipa spadaju proteini koji se direktno vežu na otrove i inhibiraju njihovo djelovanje. Najčešće se sastoje od dvije domene. N-terminalna domena je važna za transkripcijsku autoregulaciju, a C-terminalna domena, u većini slučajeva, interferira s katalizom u aktivnom mjestu otrova (Chan i sur., 2016). Pri normalnim staničnim uvjetima, formira se kompleks otrov-protuotrov koji se sastoji od stabilnog otrova i odgovarajućeg, manje stabilnog, protuotrova. Smanjena stabilnost protuotrova služi za brzi odgovor stanice na promjenu uvjeta te omogućava brzu razgradnju protuotrova staničnim proteazama. Razgradnjom protuotrova oslobađa se otrov, koji onda negativno djeluje na stanicu i često uzrokuje staničnu smrt (Chan i sur., 2016). Jedan od primjera je sustav MazEF kod *E. coli*. MazE se omota oko površine MazF i tako blokira aktivno mjesto te istisne S1-S2 omču koja stabilizira katalitičku trijadu otrova (Kamada i sur., 2003). Drugi primjer je sustav PezAT, pronađen u Gram-pozitivnoj patogenoj bakteriji *Streptococcus pneumoniae*, gdje PezA sterički zaklanja vezno mjesto ATP/GTP unutar PezT (Khoo i sur., 2007). Postoje i sustavi u kojima se protuotrov veže na otrov, ali ne zaklanja njegovo aktivno mjesto. Takav primjer je sustav HigAB nađen kod *Proteus vulgaris*, ali i kod patogena poput *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* CFT073 i *E. coli* O157:H7 (Schureck i sur., 2014).

Sustav otrov-protuotrov tipa III sastoji se od RNA molekule protuotrova koja se čvrsto veže za protein odgovarajućeg otrova. RNA protuotrov sastoji se od više tandemskih ponavljanja, koja se posttranskripcijski cijepaju uz pomoć odgovarajuće endonuklease otrova. Cijepanjem RNA protuotrova nastaju male aktivne jedinice koje blokiraju aktivno mjesto otrova u omjeru 1:1 (Chan i sur., 2016; Blower i sur., 2012). Dosadašnja istraživanja su pokazala kako se svi sustavi ovog tipa mogu svrstati u tri porodice na temelju sličnosti u sekvencama otrova (Blower i sur., 2012). Prvi takav otkriveni sustav je ToxIN (Slika 3). Nađen je na plazmidu pECA1039, Gram-negativne fitopatogene bakterije, *Pectobacterium atrosepticum*. Protuotrov *toxI* štiti *eng.* housekeeping RNA od endonukleazne aktivnosti ToxN. RNA *toxI* je preferencijalni supstrat za ToxN te nakon cijepanja formira trokutasti kompleks koji se sastoji od tri molekule proteina ToxN i tri molekule *toxI* RNA (Slika 2B i C). Molekule RNA *toxI* tvore pseudočvorove i prekrivaju aktivna mjesta ToxN (Blower i sur., 2012).



Slika 3. (A) shematski prikaz lokusa *toxIN*. ToxI je kodiran sa 5.5 tandemskih ponavljanja (žute strelice pokazuju cijela ponavljanja, a siva polovično). Crni kvadratići označavaju konstitutivni promotor, a početak transkripcije označava crna strelica. (B) i (C) prikaz trimerne strukture ToxIN (ToxI prikazan narančastom bojom). Preuzeto od: Blower i sur., 2012.

Protuotrovi tipa IV razlikuju se od svih ostalih tipova. Oni ne djeluju direktno na otrov, već antagonistički djeluju na istu staničnu metu kao i otrov (Chan i sur., 2016). Najbolje istražen primjer ovog tipa je sustav *cbeA/cbtA* kod *E. coli* K-12. CbtA inhibira polimerizaciju proteina MreB i FtsZ koji grade bakterijski stanični kostur. Istraživanja *in vitro* pokazala su da CbeA (novi naziv, predložen u radu Masuda i sur., 2012; dotadašnji naziv je bio YeeU) djeluje antagonistički na te iste proteine, tako što pospješuje izgradnju njihovih filamentoznih polimera. CbeA neutralizira i djelovanje nekih drugih inhibitora, kako što su A22, SulA i MinC (Masuda i sur., 2012).

Nedavno su otkrivena dva nova tipa sustava otrov-protuotrov, tip V i tip VI. Protuotrov tipa V je RNaza koja cijepa mRNA odgovarajućeg otrova. Jedini takav otkriveni sustav je *ghoST*. Pri normalnim staničnim uvjetima RNaza *ghoS* pocijepa mRNA *ghoT*. Međutim, u stresnim uvjetima, mRNA protuotrova *ghoS* biva razgrađena od strane MqsR, otrova tipa II. Time se omogućava translacija *ghoT* i nastanak malog hidrofobnog peptida koji oštećuje staničnu membranu (Page i Peti, 2016).

U bakteriji *Caulobacter crescentus* otkriven je sustav za koji se smatra da bi mogao predstavljati novi tip sustava otrov-protuotrov, nazvan tip VI (Chan i sur., 2016). Otrovi SocB veže se na β kopču DnaN te tako blokira elongacijsku fazu replikacije. Protuotrov SocA, vežući se za proteazu ClpXP, dovodi do razgradnje SocB (Page i Peti, 2016). Iako su i kod tipa II otrov i protuotrov proteini, razlika je u tome što su kod tipa II protuotrovi manje stabilna komponenta, dok je kod tipa VI otrov taj koji je podložniji proteolitičkoj razgradnji (Chan i sur., 2016).

2.3. Mehanizmi regulacije sustava tipa I i II

Sustav otrov-protuotrov tipa I reguliran je na razini translacije. Operon tipa I se sastoji od gena koji kodira protuotrov nakon kojeg slijedi gen koji kodira otrov (Slika 2). Transkripcijom gena koji kodira otrov nastaje primarni transkript koji se ne može translirati zbog sekundarnih struktura na 5' kraju UTR (*eng.* untranslated region). Procesiranjem 5' ili 3' kraja, ovisno o kojem otrovu se radi, dolazi do promjene u strukturi i nastajanja aktivne mRNA otrova (Berghoff i Wagner, 2017). U prisutnosti protuotrova ne dolazi do translacije otrova, već se protuotrov veže za primarni transkript otrova i takav kompleks onda biva razgrađen RNazama (Harms i sur., 2018).

Protuotrov tipa I se konstitutivno transkribira, neovisno o transkripciji otrova. Na transkripciju otrova tipa I mogu utjecati razni unutarstanični signali, kao npr. LexA koji je dio staničnog odgovora na stres (*eng.* SOS response). Ukoliko stanica nije u stresnim uvjetima, LexA inhibira transkripciju otrova. Primjer tako reguliranog otrova je *tisB* kod *E. coli* (Berghoff i Wagner, 2017).

Transkripcijska autoregulacija je karakteristična za sustave tipa II. Ekspresija lokusa tog tipa najčešće je regulirana samo jednim promotorom koji se nalazi uzvodno od gena za protuotrov (Slika 2). Protuotrov se svojom N-terminalnom domenom veže za jedan ili više operatora, koji se nalaze unutar promotorske regije, i djeluje kao represor. U nekim slučajevima se represija, odnosno afinitet N-terminalne domene, može pojačati ukoliko se za protuotrov veže odgovarajući otrov (Page i Peti, 2016).

Razina transkripcijske autoregulacije ovisi o omjeru otrov:protuotrov (O:P). 1988. godine je prvi put otkriveno da pretjerana količina otrova, suprotno očekivanjima, de-reprimira transkripciju. Taj fenomen se od tada naziva *eng.* conditional cooperativity (Page i Peti, 2016). Jaka represija sustava otrov-protuotrov, primjećena kod niskog omjera O:P, omogućava stanici da u normalnim uvjetima rasta ne troši nepotrebno metaboličku energiju. Razgradnjom protuotrova omjer O:P raste, povećava se ekspresija odgovarajućeg lokusa, povećava se količina slobodnog otrova i inhibira se rast stanice (Cataudella et al., 2012).

3. Biološke funkcije sustava otrov-protuotrov

Razni tipovi sustava otrov-protuotrov se već desetljećima istražuju na brojnim bakterijskim vrstama, ponajviše na sojevima koji služe kao modelni organizmi, te je njihov molekularni mehanizam poznat do detalja. Međutim, povezanost njihove molekularne aktivnosti s biološkim funkcijama je još uvijek nejasna i nedovoljno istražena (Harms i sur., 2018). Do sada su samo tri glavne biološke funkcije tog sustava eksperimentalno potvrđene i općeprihvaćene. To su redom: sprječavanje gubitka plazmida, *eng.* post-segregational killing (PSK), altruističko samoubojstvo, *eng.* abortive infection i perzistentno stanje (ili dormancija), *eng.* persister formation (Harms i sur., 2018).

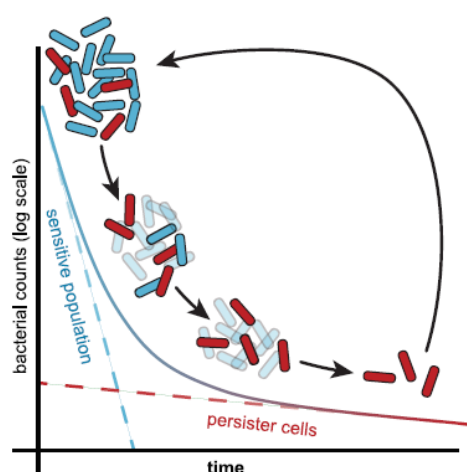
Lokusi sustava otrov-protuotrov tipa I i II prvotno su otkriveni zbog uočene povezanosti sa specifičnim načinom stabilizacije plazmida u bakterijskim stanicama, poznatim pod nazivom PSK (Harms i sur., 2018). PSK se temelji na razlikama u stabilnosti kratkoživućeg protuotrova i stabilnog otrova. Otrovi uzrokuju smrt stanica kćeri koje su izgubile plazmid, pa ne mogu kontinuirano eksprimirati protuotrov (Jensen and Gerdes, 1995).

PSK se ne odnosi samo na mehanizam stabilizacije plazmida, već i pokretnih genetičkih elemenata i drugih nestabilnih regija u genomu bakterija. U mnogim bakterijama pronađeni su integrativni i konjugativni elementi, *eng.* integrative and conjugative elements (ICE) koji se mogu integrirati u kromosom domaćina i konjugacijom prenositi u druge stanice. SXT je ICE u bakteriji *Vibrio cholerae*, koji sadrži gene za rezistenciju na brojne antibiotike (Wozniak i Waldor, 2009). SXT, kada se izreže iz kromosoma, formira kružnu molekulu koja se onda konjugacijom može prenijeti u druge bakterije. Međutim, postoji mogućnost da se takav SXT izgubi kod stanica kćeri, ukoliko dođe do diobe prije nego se SXT reintegrira. Gubitak SXT sprječava sustav otrov-protuotrov *mosAT*. Geni *mosA* i *mosT* dio su SXT. Prilikom izrezivanja te regije njihova se ekspresija povećava i aktivira se PSK (Wozniak i Waldor, 2009).

Jedan od načina obrane bakterija od bakteriofaga je altruističko samoubojstvo uz pomoć sustava otrov-protuotrov. Ovaj fenomen je prvotno otkriven kod infekcije *E. coli* bakteriofagom T4, gdje u obrani sudjeluju sustav *hok/sok* tipa I i nekoliko sustava tipa II, kao što su *mlAB* i *mazEF* (Harms i sur., 2018). Detaljnije objašnjenje nalazi se u poglavlju 4. Smatra da se je altruističko samoubojstvo primarna biološka funkcija sustava otrov-protuotrov tipa III. Primjer su sustavi *toxIN* i *tenpIN* porodice, koji sprječavaju širenje infekcije bakteriofagima u brojnim bakterijama poput *Lactococcus lactis*, *Photobacterium luminescens* i *E. coli* (Goeders i sur., 2016).

Kao odgovor na altruističko samoubojstvo, bakteriofagi su razvili brojne mehanizme koji onemogućavaju djelovanje sustava otrov-protuotrov. Fag T4 kodira univerzalni protuotrov koji inaktivira nekoliko otrova iz porodice RnIA (Otsuka i Yonesaki, 2012). Zajedno sa DNA faga T4 u stanicu domaćina ulazi i Alt, ADP-riboziltransferaza. Eksperimentalno je potvrđeno da Alt ADP-ribozilira arginin u MazF (otrov tipa II u *E. coli*) i time inhibira njegovu aktivnost (Alawneh i sur., 2016). Velik broj bakteriofaga može inhibirati proteaze koje razgrađuju protuotrove, čime indirektno sprječavaju altruističko samoubojstvo uzrokovano sustavima tipa II i tipa IV. Smatra se da fag T7 može inaktivirati proteazu Lon, ključnu za razgradnju brojnih protuotrova u *E. coli* (Sberro i sur., 2013).

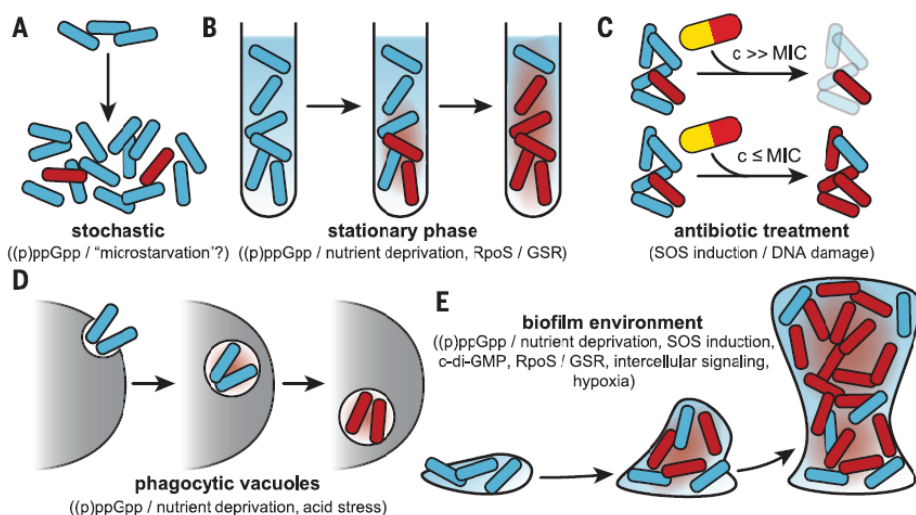
Perzistentno stanje se može javiti kod određene skupine stanica, unutar bakterijske populacije, kao odgovor na tretiranje antibioticima ili izloženost stresnim čimbenicima u okolišu. Stanice tada prelaze u dormantni fenotip u kojem su stanični procesi, na koje antibiotici najčešće djeluju, neaktivni. Nakon ponovne uspostave normalnih uvjeta, stanični procesi se aktiviraju i stanice se ponovno mogu dijeliti (Page i Peti, 2016). Prve takve stanice uočio je Joseph Bigger. Naišao je na dio stanica, u populaciji stafilokoka, koje su bile otporne na tretman penicilinom i nazvao ih *eng. persisters* (Bigger, 1944). Prisutnost perzistentnih stanica može se detektirati preko dvofaznog ubijanja, *eng. „biphasic killing“* fenomena, uslijed tretmana antibiotikom. Prvo dolazi do naglog pada broja stanica u populaciji, osjetljivih na antibiotik, a u drugoj fazi sporo ubijanje i malog broja perzistentnih stanica (Slika 4) (Balaban i sur., 2004).



Slika 2. Fenomen dvofaznog ubijanja kao posljedica tretmana antibiotikom. Preuzeto od: Harms i sur., 2016.

Do formiranja perzistentnih stanica dolazi kombinacijom slučajnih mehanizama i mehanizama koji se aktiviraju u nepovoljnim uvjetima (Arnoldini i sur., 2012). Perzistentno stanje nastalo slučajnim mehanizmima najčešće se objašnjava kao „prilagodba životnim

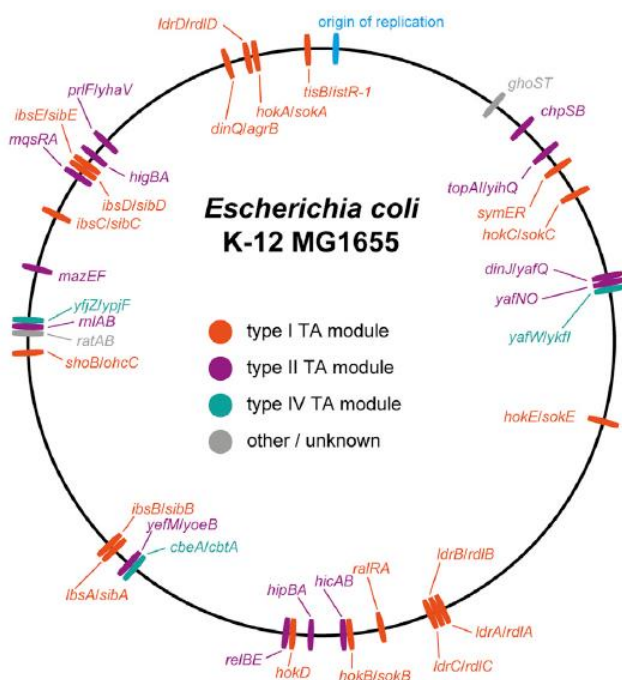
uvjetima“ ili *eng.* bet-hedging. Bet-hedging je evolucijski mehanizam koji se zasniva na fenotipskoj heterogenosti, kako bi se maksimalno povećao fitnes izogene populacije u dinamičnom okolišu (De Jong i sur., 2011). Prilikom nepovoljne promjene uvjeta u okolišu dolazi do formiranja većeg broja perzistentnih stanica, što nazivamo *eng.* responsive persister formation (Khoo i sur., 2007). Oba načina nastajanja perzistentnih stanica regulirana su istim unutarstaničnim signalnim putevima. Najistaknutiji primjer, koji je zajednički gotovo svim vrstama perzistentnih stanica, je (p)ppGpp (gvanozin pentaforfat/tetraforfat) signalizacija. Ostali signalni putevi, poput SOS odgovora i signalizacije uzrokovane hipoksičnim uvjetima, imaju uglavnom modulatornu ulogu (Slika 5) (Harms i sur., 2016). Dugotrajno povišena koncentracija (p)ppGpp pokazala se ključnim parametrom perzistencije te je povezana s regulacijom sustava otrov-protuotrov, najčešće tipa II, koji sudjeluju u formiranju perzistentnog fenotipa (Tian i sur., 2017).



Slika 3. Okolišni čimbenici i stanični signali koji utječu na formiranje perzistentnih stanica. Plavom bojom su označene stanice koje normalnu rastu, a crvenom perzistente stanice. MIC - minimalna koncentracija inhibitora; GSR – opći odgovor na stres (*eng.* general stress response). Preuzeto od: Harms i sur., 2016.

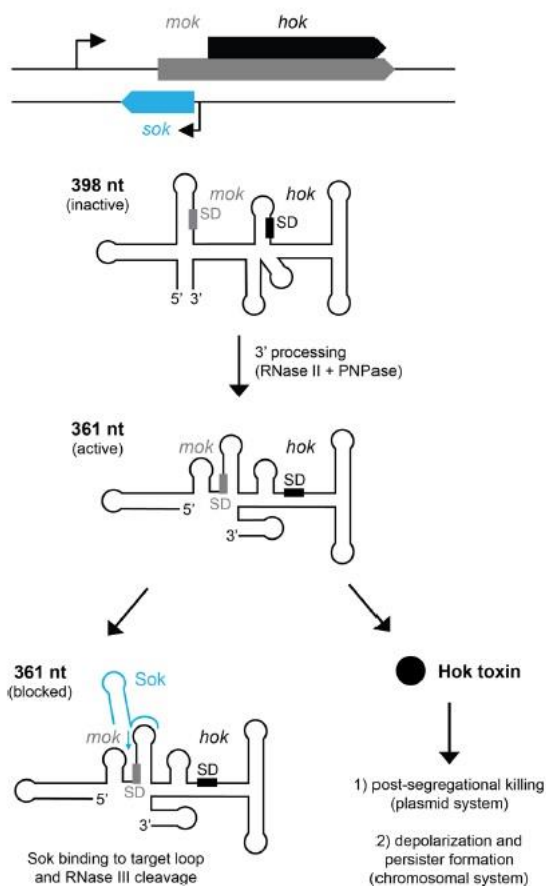
4. Sustavi otrov-protuotrov u genomu *E.coli* K-12

Escherichia coli je Gram-negativna gamaproteobakterija, čiji se sojevi K-12 i B često koriste kao modelni organizmi u molekularnim istraživanjima. *E. coli* K-12 MG1655 glavni je modelni organizam u većini istraživanja mehanizma otrov-protuotrov. U genomu sadrži barem 19 lokusa sustava tipa I, 13 lokusa tipa II i 3 lokusa tipa IV, prikazana na Slici 6 (Harms i sur., 2018).



Slika 6. Prikaz svih poznatih kromosomskih lokusa sustava otrov-protuotrov u modelnom organizmu *E.coli* K-12 MG1655. Preuzeto od: Harms i sur., 2018.

Veliki dio sustava tipa I, u genomu *E. coli*, pripada porodici gena *hok/sok*. Hok dolazi od *eng.* host killing, a sok od *eng.* suppressor of killing (Gerdes i sur., 1986). *Hok* kodira visoko toksični transmembranski protein, koji nepovratno oštećuje staničnu membranu. Translacija *hok* ovisi o translaciji *mok* (*eng.* modulation of killing). *Mok* se nalazi uzvodno od *hok* i njihovi okviri čitanja se preklapaju. Transkripcijom se dobije *mok-hok* primarni transkript dug 398 nukleotida, koji se ne može translirati zbog nastalih sekundarnih struktura. Procesiranjem uz pomoć RNaze II i poliribonukleotid nukleotidil-transferaze (PNPaza), uklanja se 39 nukleotida sa 3' kraja i inducira promjena strukture, čime nastaje translacijski aktivna mRNA. *Sok* RNA može indirektno inhibirati translaciju *hok* tako što inhibira translaciju *mok*, vežući se za omču između *mok* i *hok*. Vezanjem *sok* nastaje RNA heterodupleks, kojeg ubrzo razgradi RNaza III (Slika 7) (Berghoff i Wagner, 2017; Gerdes i Wagner, 2007).



Slika 7. Regulacija sinteze otrova Hok, objašnjena u prethodnom tekstu. Plava strelica označava stvaranje RNA heterodupleksa. SD – kratica za Shine-Dalgarno slijed. Hok može imati ulogu u raznim biološkim funkcijama poput PSK i *eng.* persister formation (poglavlje 3). Preuzeto od: Berghoff i Wagner, 2017.

Gotovo svi otrovi tipa II kod *E. coli* K-12 su mRNA endonukleaze, od čega ih sedam spada u porodicu RelBE (Harms i sur., 2018). RelE reže mRNA u A mjestu ribosoma, s visokom specifičnošću za kodone, čime inhibira sintezu proteina. Najbrže reže na mjestu UAG stop kodona i na UCG i CAG kodonima, između druge i treće baze (Pedersen et al., 2003). RelB je protuotrov koji direktnom protein-protein interakcijom neutralizira RelE. Ekspresija *relBE* je jako niska pri uvjetima normalnog staničnog rasta. Ukoliko stanice dođu u fazu gladovanja transkripcija *relBE* značajno poraste. U stanju gladovanja aktivira se i proteaza Lon koja razgradi RelB. Slobodni RelE inhibira sintezu proteina, što štedi energiju i omogućava bakteriji preživljavanje u uvjetima s malo dostupne hrane (Christensen i Gerdes, 2003).

Poznate su samo dvije porodice sustava otrov-protuotrov tipa IV (Harms i sur., 2018). U *E. coli* K-12 se nalazi *cbeA/cbtA*, čiji je mehanizam prethodno objašnjen u poglavlju 2.2.

5. Literatura

- Alawneh, A.M., Qi, D., Yonesaki, T., and Otsuka, Y. (2016). An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the Escherichia coli MazF toxin of a toxin-antitoxin module. *Mol. Microbiol.* 99, 188–198.
- Arnoldini, M., Mostowy, R., Bonhoeffer, S., Ackermann, M. (2012). Evolution of stress response in the face of unreliable environmental signals. *PLOS Comput. Biol.* 8, e1002627
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622–1625
- Berghoff, B.A., and Wagner, E.G.H. (2017). RNA-based regulation in type I toxin-antitoxin systems and its implication for bacterial persistence. *Curr. Genet.* 63, 1011–1016.
- Bigger, J.W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, 244, 497–500.
- Blower, T.R., Short, F.L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X.Y., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P. (2012). Identification and classification of bacterial type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* 40, 6158–6173.
- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K., and Mitarai, N. (2012). Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Res.* 40, 6424–6434.
- Chan, W.T., Espinosa, M., and Yeo, C.C. (2016). Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems. *Front. Mol. Biosci.* 3, 9.
- Christensen, S.K., and Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol. Microbiol.* 48, 1389–1400.
- De Jong, I. G., Haccou, P., Kuipers, O.P. (2011). Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *BioEssays* 33, 215–223.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B., and Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3116–3120.
- Gerdes, K., Wagner, E.G.H. (2007). RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 117–124.

- Goeders, N., Chai, R., Chen, B., Day, A., and Salmond, G.P. (2016). Structure, evolution, and functions of bacterial type III toxin-antitoxin systems. *Toxins (Basel)* 8, E282.
- Harms, A., Brodersen, D.E., Mitrai, N., Gerdes, K. (2018). Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Mol. Cell* 70, 768-784.
- Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354, aaf4268-1–aaf4628-9.
- Jensen, R.B., and Gerdes, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* 17, 205–210.
- Jurėnas, D., Chatterjee, S., Konijnenberg, A., Sobott, F., Droogmans, L., Garcia-Pino, A., and Van Melderen, L. (2017). AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}. *Nat. Chem. Biol.* 13, 640–646.
- Kamada, K., Hanaoka, F., and Burley, S.K. (2003). Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* 11, 875–884.
- Khoo, S. K., Loll, B., Chan, W. T., Shoeman, R. L., Ngoo, L., Yeo, C. C., et al. . (2007). Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 282, 19606–19618.
- Kotte, O., Volkmer B., Radzikowski, J. L., Heinemann, M. (2014). Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Mol. Syst. Biol.* 10, 736.
- Lederberg, J. (1952.). Cell genetics and hereditary symbiosis, *Phys. Rev.* 32.4, 403-430.
- Masuda, H., and Inouye, M. (2017). Toxins of prokaryotic toxin-antitoxin systems with sequence-specific endoribonuclease activity. *Toxins (Basel)* 9, E140.
- Ogura, T., and Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4784–4788.
- Otsuka, Y., and Yonesaki, T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnIA toxins. *Mol. Microbiol.* 83, 669–681.
- Pedersen, K., Zavialiv, A., Pavlov, M., Elf, J., Gerdes, K., and Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 112, 133–142.
- Page, R., and Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 12, 208–214.
- Sberro, H., Leavitt, A., Kiro, R., Koh, E., Peleg, Y., Qimron, U., and Sorek, R. (2013). Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol. Cell* 50, 136–148.

- Schureck M. A., Maehigashi T., Miles S. J., Marquez J., Cho S. E., Erdman R., et al. . (2014). Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)₂-HigB toxin-antitoxin complex. *J. Biol. Chem.* 289, 1060–1070.
- Tian, C., Semsey, S., and Mitarai, N. (2017). Synchronized switching of multiple toxin-antitoxin modules by (p)ppGpp fluctuation. *Nucleic Acids Res.* 45, 8180–8189.
- Wozniak, R.A., and Waldor, M.K. (2009). A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet.* 5, e1000439.

6. Sažetak

Bakterije su razvile iznimnu sposobnost prilagodbe na različite životne uvjete. Uz pomoć raznih sustava i mehanizama daju brz stanični odgovor na stresore, tretman antibiotikom, stanje gladi i ostale nepovoljne uvjete. Jedan takav sustav pronađen je u kromosomu mnogih bakterija, ali i u plazmidima i drugim pokretnim elementima. Sastoji se od dva gena od kojih jedan kodira otrov, a drugi protuotrov. Otrovi su proteini koji interferiraju s vitalnim procesima, čime inhibiraju rast ili uzrokuju smrt stanice. Aktivnost otrova reguliraju protuotrovi koji ih direktno ili indirektno inhibiraju. S obzirom na to kakvim mehanizmom protuotrov djeluje na otrov, razlikujemo šest tipova sustava otrov-protuotrov. Sustavi otrov-protuotrov tipa II imaju i mehanizam transkripcijske autoregulacije, koji je reguliran omjerom otrov: protuotrov. Stanični signali poput (p)ppGpp i proteini koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres također mogu regulirati transkripciju sustava otrov-protuotrov. Sustavi otrov-protuotrov koji se nalaze na plazmidima i drugim pokretnim elementima sudjeluju u stabilizaciji istih preko PSK mehanizma, dok oni na kromosomu imaju ulogu u *eng.* abortive infection i *eng.* persister formation. Glavni modelni organizam u istraživanju sustava otrov-protuotrov je soj gamaproteobakterije *E. coli* K-12.

Sustavi otrov-protuotrov pokazali su se kao mogući uzrok sve češćeg neuspjelog tretmana antibioticima. Razlog tome je perzistentno stanje koje omogućava bakterijama da se nakon tretmana antibiotikom ponovno razvije normalno rastuća populacija. U tijeku su istraživanja novih vrsta lijekova koji bi spriječili nastanak perzistentnog stanja. Međutim, i dalje nije razjašnjeno koja je točno veza između određenih sustava otrov-protuotrov i neke biološke funkcije, odnosno kada i kako točno će neki sustav reagirati na određene uvjete.

7. Summary

During the course of their evolution, bacteria have developed an astounding ability to adapt to a wide variety of living conditions. Various cellular systems and mechanisms ensure rapid response to different stressors, antibiotics, starvation and other unfavourable conditions. One such system has been discovered both in chromosomal DNA and in mobile elements of bacteria. Its loci consist of two genes: one encodes a toxin, and the other encodes a cognate antitoxin. Toxins are proteins that interfere with vital cellular functions to inhibit bacterial growth, and can even cause apoptosis. Antitoxin control their cognate toxin through direct interactions, or through transcriptional and translational regulation of expression. Six types of these system have been described based on the nature of the antitoxin and how it inhibits the activity of the toxin protein. Transcriptional autoregulation of toxin-antitoxin (TA) modules is particularly prevalent among type II TA modules and is based on a T:A ratio. Transcription of TA modules can also be regulated by cellular signals such as (p)ppGpp and SOS signaling proteins. Some TA modules can prevent the loss of plasmids or other mobile elements from bacterial cultures through a mechanism known as PSK. TA modules found in chromosomal DNA of bacteria could be involved in abortive infection and persister formation mechanism. *E. coli* K-12 is the main model organisms in research of TA system.

Increasingly appreciated reason that antibiotics fail is because the bacteria use TA system to evade antibiotic exposure by persistent mechanism. Once relieved, the persisters can revert back to the actively growing state and repopulate the original population. Given the pressing need for new antibiotics, novel approaches that target TA systems and the processes that regulate them are warranted. One of the problems is that despite significant efforts, it has remained unclear how the molecular features and activities of TA modules are translated into biological function.